

運動と睡眠の質をつなぐ神経回路の解明

本堂茉莉¹、船戸弘正¹、Yoan Cherasse¹、松井崇²、征矢英昭²、柳沢正史¹

¹筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構

²筑波大学人間総合科学研究科運動生化学

Sleep, exercise, and diet are three major factors for good health. However, there have been few studies addressing how brain governs the interaction of these three factors. In this study, we examined the regulation of non-REM sleep (NREM) delta power (slow wave activity) after treadmill exercise.

Using EEG/EMG recordings in C57BL/6J male mice, we investigated sleep/wakefulness pattern and NREM delta power after treadmill exercise. High intensity exercise increased NREM delta power and NREM sleep amount. In the presence of reward/energy supply showed high NREM delta power immediately after treadmill exercise. While C57BL/6J mice showed increased NREM delta power after exercise, *orexin/ataxin3* mice as well as *OX1R^{-/-};OX2R^{-/-}* mice exhibited normal NREM delta power after exercise. These results suggest that the orexin system may have a role in coordinating the interaction of the sleep, exercise and diet, through the modulation of NREM delta power.

1. 諸言

良い運動と良い睡眠は、心身の健康に不可欠である。アスリートは睡眠を重視しており、パフォーマンス維持のための体調管理法として睡眠を積極的に取り入れている。実際にヒトでの研究で、積極的な睡眠によりスポーツや日中のパフォーマンスが向上することはよく知られている。このように、睡眠が運動パフォーマンスに与える効果はよく理解されているが、逆に運動（身体エクササイズ）が睡眠に及ぼす影響は厳密に研究されていない。運動後の熟眠は誰もが体験するところであり、実際にヒトの研究において、運動が深い睡眠の増加や睡眠潜時の短縮をもたらすことが知られている (Kubitz et al. Sport Med 1996 ; Chennaoui et al Sleep Med Rev 2014)。しかし、日常的に経験する睡眠と運動の密接な関係にもかかわらず、運動がどのようにして睡眠に影響をあたえるのかは明らかではない。

本研究は、運動が睡眠の質に与える影響を明らかにし、その遺伝子および神経回路を同定することを目的とした。ヒト研究では詳細な神経機構、分子機構を検討することができず、運動がどのような機序によって睡眠量や睡眠の質を制御しているのか調べるのが難しい。また睡眠は脳が制御する現象であるため、運動と睡眠の関係を司る原理を理解するには、脳部位特異的な遺伝子操作が可能なマウスが優れたモデル動物となる。ヒトの睡眠と同様に、マウスの睡眠も大部分はノンレム睡眠が占め、ノンレム睡眠中の脳波はデルタ波と呼ばれる遅い周波数(1-4Hz)成分が主体である。このデルタ波成分は、深い睡眠相で顕著に出現することや、睡眠遮断後に増加することから、深い眠り、つまり「睡眠の質」の指標とされている。このノンレム睡眠中の脳波の徐波振幅(δ波パワー)を用いて客観的に睡眠の質を評価し、睡眠の質を再現性良く改善する運動条件を決定することができれば、遺伝子改変マウスやウイルスベクターを用いて、運動と睡眠の質をつなぐ神経回路を明らかにすることができる。

2. 研究方法

高い運動強度では、酸化的リン酸化によるエネルギー産生だけで必要なエネルギー供給を満たすことができなくなるため、筋肉に蓄えられたグリコーゲンがエネルギー供給に動員される。この時、乳酸が産生・蓄積されるようになり、疲労する。乳酸が産生される運動強度の閾値は乳酸性作業閾値 (lactate threshold; LT) と呼ばれ、換気性作業閾値 (ventilation threshold; VT (運動強度を増していくとき、呼気中の二酸化炭素排出量から無酸素性作業閾値を決定したもの) とほぼ同じ値となる。運動強度はこれらの閾値の上下で質的に全く異なると考えられていることから、睡眠への影響もこの閾値の上下で検討し、睡眠へ良質な影響を与えながら過度の運動とならない条件を決定した。

換気性作業閾値の決定には、筑波大学体育系の征矢英昭教授の協力により呼気ガス分析装置一体型トレッドミル運動装置を用いて、マウスの運動時の呼気ガスを測定した。この装置にはガス濃度の測定に質量分析を使用しており、装置は質量分析部および導入部、制御用コンピューターから構成される。マウスのような小動物の呼気ガス量は微量であるため、このように精度の高い測定装置が必要である。

次に、得られた換気性作業閾値 (12.5m/min, 資料未掲載) に基づきトレッドミルのスピードを設定し 2 週間の運動トレーニングを行った。マウスの睡眠覚醒を正確に測定・評価するため C57BL/6J 雄マウス (10 週令) の頭蓋骨に脳波および筋電を測定するための電極を取付け、1 週間の回復後、トレッドミル運動装置により強制運動トレーニングを行った。マウスの頭蓋に設置した電極と記録装置を繋ぐテザーはトレーニング中も継続的に接続した (図 1)。換気性作業閾値前後を中強度運動、換気性作業閾値以下を低強度運動、換気性作業閾値以上を高強度運動とし、運動強度による睡眠への影響について検討した。トレーニングはトレッドミル運動装置を用い、徐々に運動強度を上げながら、1 日 1 回 30 分、計 8 回行った。トレーニングの後半には 20 m/分のスピードで 30 分間走るようになった。なお、2 週間の運動トレーニングは、マウスの新規探索行動の影響を除外する目的および慣れないトレッドミルでの走行を継続的に行わせるための訓練の意味を含めて設定した。睡眠覚醒量の測定は、1) 初回トレーニング開始以前、2) 最終トレーニング終了直後から継続して 1 週間、3) 最終トレーニング終了後 1 ヶ月の時点で行った。記録した睡眠・覚醒ステージの判定および高速フーリエ変換による脳波周波数解析は、MatLab(MathWorks) で作製した自作プログラムにより行った。運動によるノンレム睡眠中デルタ周波数域 (1Hz-4Hz) の増大は、初回トレーニング以前に記録した睡眠時脳波データを、運動後の睡眠時脳波データと比べることによって評価した。

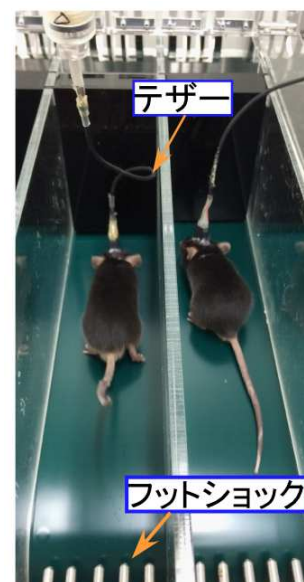


図 1 : マウス用トレッドミル運動装置

3. 結果

ノンレム睡眠時のデルタ波スペクトル値が大きければ大きいほど、深く、質のよい睡眠とされており、ヒト睡眠ではノンレム睡眠のステージ 3 のような深い睡眠でデルタ波が顕著になる。マウスの睡眠においても、長い覚醒に続いて入眠した場合は、デルタ波スペクトル値が大きくなる。デルタ波 (1-4Hz) の発生には大脳新皮質と視床の双方が関与していると考えられている。深いノンレム睡眠時には、覚醒の制御に強くかかわる領域である脳幹や前脳基底部などに局在する神経活動が顕著に低下す

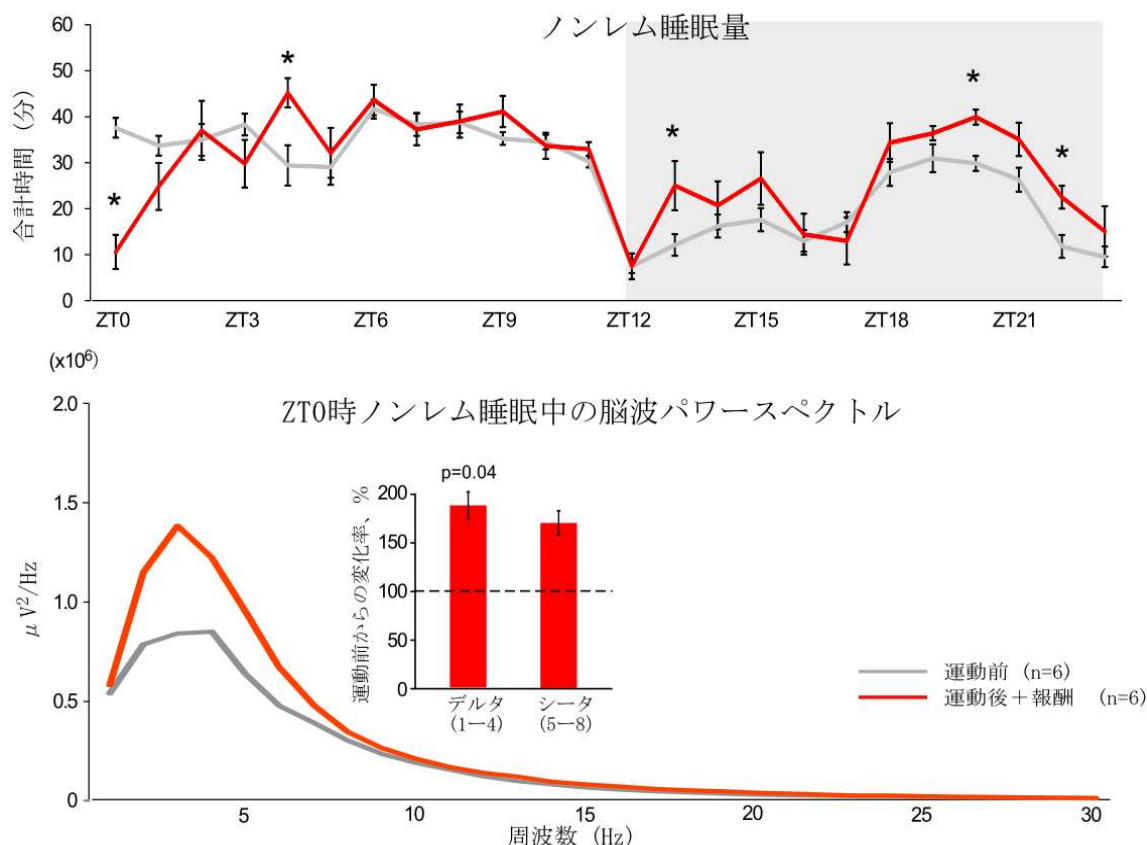


図 2：運動直後にノンレム睡眠中のデルタ波量が増加する。

(グラフ上) 各時間 (Zeitgeber time (ZT)) における高強度運動後のノンレム睡眠量変化 (運動前：灰色線、運動後：赤線)。(グラフ下) 運動 1 時間後 (ZT0) におけるノンレム睡眠時の脳波パワースペクトル、(グラフ内側) デルタ波 1-4Hz およびシータ波 5-8Hz における運動前からの変化率。

る。これは、脳が休息状態にあることを示している。我々がマウスを用いて運動を行った結果、高強度運動後 (20m/min で 30 分間) のノンレム睡眠時のデルタ波スペクトル値は、非運動群よりも有意に大きくなっていった (図 2)。これは、運動したマウスのほうが深い良質な睡眠を得ていることを示している。また、ノンレム睡眠中のデルタ波の増大は、高強度運動後 3 日後においても継続していた (図 3)。

次に、図 2 で得られたノンレム睡眠時におけるデルタ波の増大が、運動以外のフットショックや運動後の報酬として与えている餌による作用でないことを明らかにする必要がある。そこで、運動前群をコントロールとし、非運動+フットショック+報酬群および運動後+非報酬群とで ZT0 時におけるノンレム睡眠中のデルタ波量を調べてみた結果、運動後に報酬が与えられなかった群では、ノンレム睡眠中のデルタ波含有量がコントロール群と比べて低かった (図 4)。また非運動+フットショック群およびコントロール群との間で差は見られなかった。しかし、運動 3 日後のノンレム睡眠中のデルタ波は図 3 で観察されたように、運動後+非報酬群ではコントロール群より有意にデルタ波量が増大していた (図 5)。しかし、非運動+フットショック群では変化は見られなかった。このことから、運動直後のノンレム睡眠時におけるデルタ波の増大には報酬が必須であることが分かった。また運動 3 日

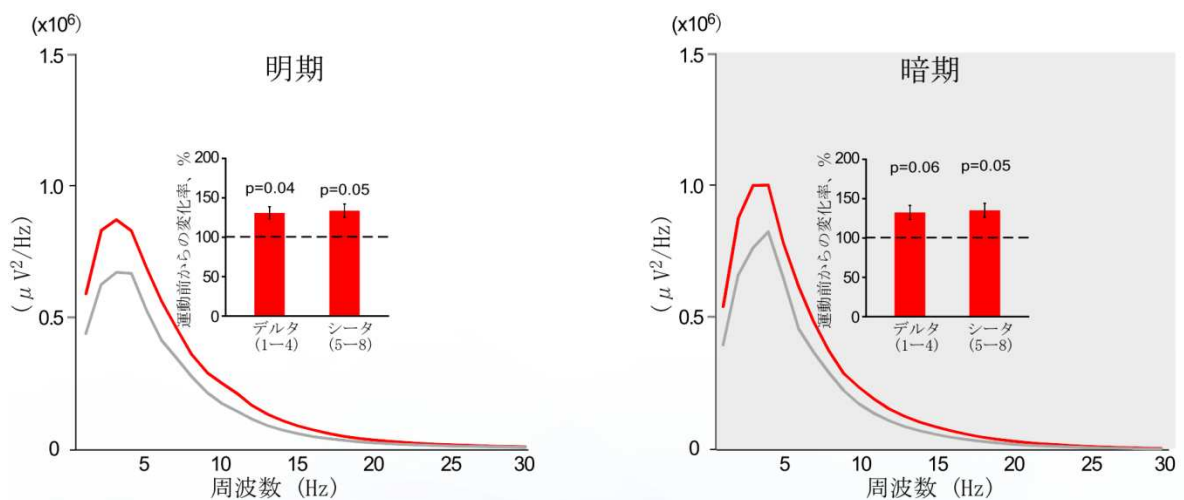


図3：運動3日後のノンレム睡眠においてもデルタ波量の増加が観察された。

(グラフ左) 明期におけるノンレム睡眠時のパワースペクトル(グラフ内側)デルタ波1-4Hz およびシータ波5-8Hzにおける運動前からの変化率。(グラフ右) 暗期におけるノンレム睡眠時のパワースペクトル(グラフ内側)デルタ波1-4Hz およびシータ波5-8Hzにおける運動前からの変化率。運動前：灰色、運動後：赤色。

後のデルタ波の増大は運動後+非報酬群で観察されたことから、運動後のデルタ波の増大は報酬やフットショックによるものではなく、運動自体が睡眠の質の向上に作用していることが明らかとなった。

運動後の「睡眠の質」向上に必要な遺伝子は、睡眠覚醒制御に関与することが知られている遺伝子の一つではないかとの仮説を立て、複数の遺伝子改変マウスを用いて運動後のノンレム睡眠中のデルタ波への影響について解析した。オレキシン、ヒスタミン、セロトニン、ノルアドレナリン、アデノシン等睡眠覚醒制御に関わる遺伝子改変マウスを用いた。そのなかで、視床下部オレキシン系に異常を持つ遺伝子改変マウスで運動後の睡眠の質向上が欠如していることを見出した。

オレキシンは摂食行動を促進する神経ペプチドとして同定されたが(Sakurai et al., Cell. 1998)、オレキシン遺伝子欠損マウスの示す顕著な睡眠異常が契機となって(Chemelli et al., Cell. 1999)、オレキシン神経の後天的な脱落によって睡眠障害ナルコレプシーが引き起こされていることが明らかとなった(Mignot et al., 2002)。ナルコレプシーは、日中の非常に強い眠気、笑いなどの情動がトリガーとなる情動脱力発作(カタプレキシー)、覚醒状態からレム睡眠への直接移行(sleep onset REM period: SO-REM)を特徴とする。オレキシン遺伝子欠損マウスは、睡眠覚醒の断片化や、カタプレキシー様行動、SO-REMを示すことから、オレキシン神経からの出力が覚醒の維持のほか、ノンレム睡眠とレム睡眠の適切な切り替えに不可欠であることが明らかとなっている。

本研究では、オレキシン神経が後天的に脱落するモデルマウス(Hara et al., 2001) *Orexin/ataxin3* マウスおよびオレキシンにはオレキシン1受容体とオレキシン2受容体の2つのサブタイプが存在し、この2種類の受容体が欠損した *Orexin double receptor knockout (OXDKO)* マウスを用いて、運動後のノンレム睡眠中のデルタ波量を計測した。なお、コントロールにはそれぞれの遺伝子改変マウスの非運動+フットショック+報酬を用いている。運動直後のノンレム睡眠中のデルタ波量を解析した結果、*Orexin/ataxin3* マウスおよび *OXDKO* マウスともに、コントロール群と比較してデルタ波量に変化は見られなかった(図6)。また、運動3日後のノンレム睡眠中のデルタ波量についても差は見ら

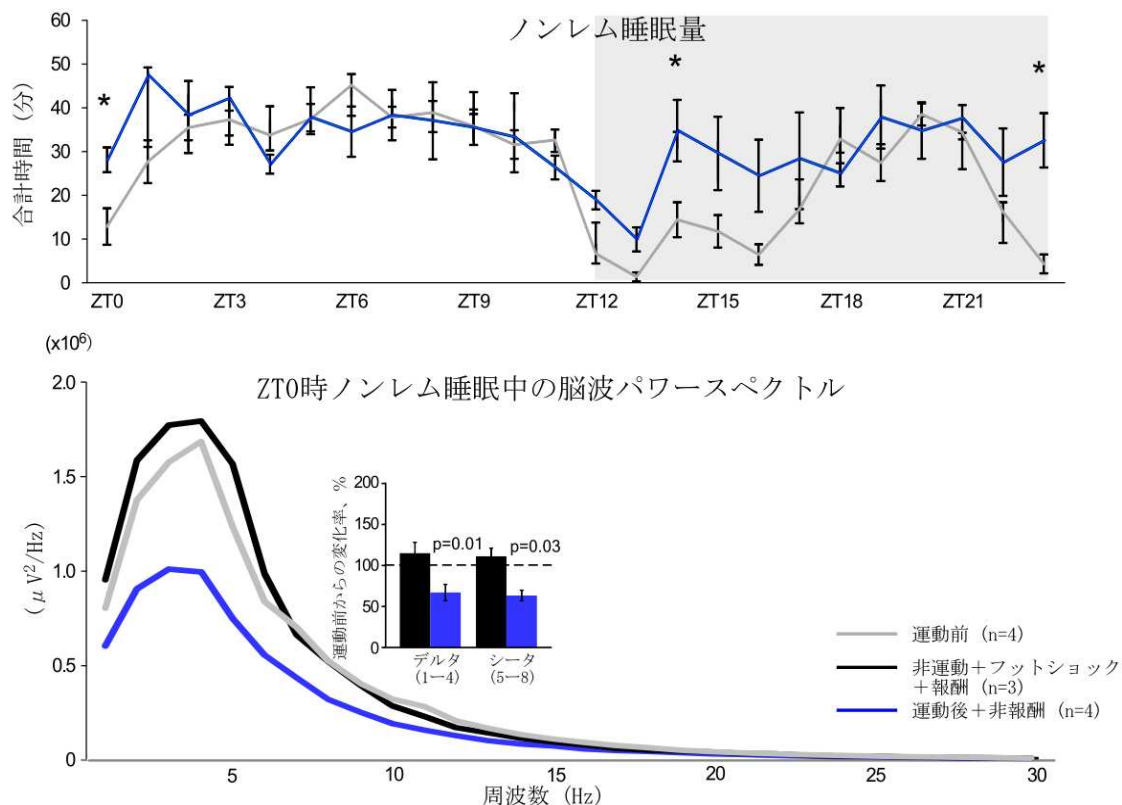


図 4：運動直後の睡眠の質の向上には報酬系が関与する。

(グラフ上) 各時間 (Zeitgeber time (ZT)) における高強度運動後のノンレム睡眠量変化 (運動前：灰色線、フットショックおよび餌のみ：黒線、運動後餌なし：青線)。(グラフ下) 運動 1 時間後 (ZT0) におけるノンレム睡眠時の脳波パワースペクトル、(グラフ内側) デルタ波 1-4Hz およびシータ波 5-8Hz における運動前からの変化率。

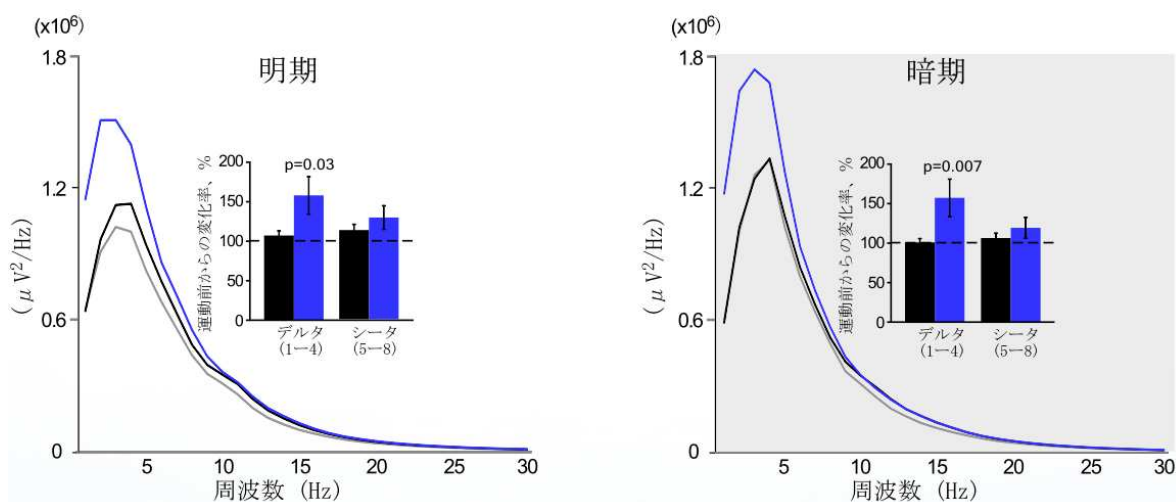


図 5：運動 3 日後の睡眠の質の向上には報酬系は作用しない。

(グラフ左) 明期におけるノンレム睡眠時のパワースペクトル (グラフ内側) デルタ波 1-4Hz およびシータ波 5-8Hz における運動前からの変化率。(グラフ右) 暗期におけるノンレム睡眠時のパワースペクトル (グラフ内側) デルタ波 1-4Hz およびシータ波 5-8Hz における運動前からの変化率。運動前：灰色、非運動+フットショック+報酬：黒色、運動後+非運動：青色

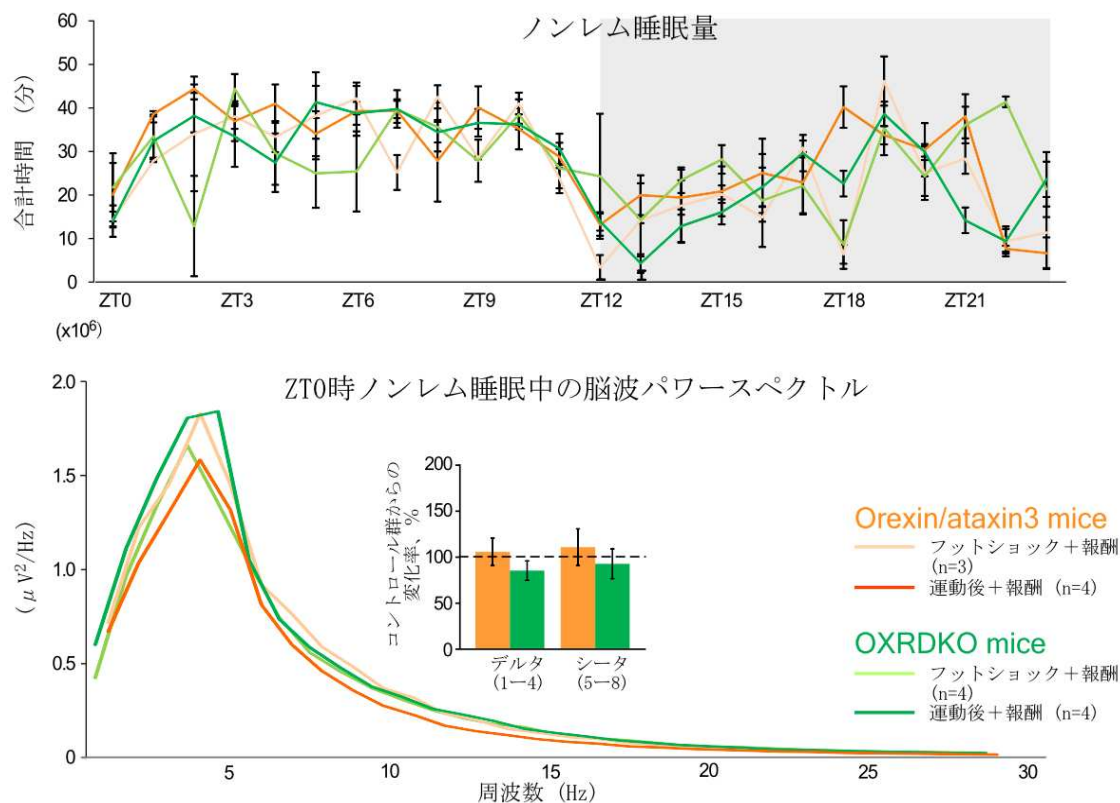


図6：オレキシン系遺伝子改変マウスでは運動直後の睡眠の質は向上しない。

(グラフ上) 各時間 (Zeitgeber time (ZT)) における高強度運動後のノンレム睡眠量変化 (*Orexin/ataxin3*: コントロール; 薄橙色、運動後; 濃橙色) (*OXRDKO*: コントロール; 薄緑色、運動後; 濃緑色)。(グラフ下) 運動1時間後 (ZT0) におけるノンレム睡眠時の脳波パワースペクトル、(グラフ内側) デルタ波 1-4Hz およびシータ波 5-8Hz における運動前からの変化率。

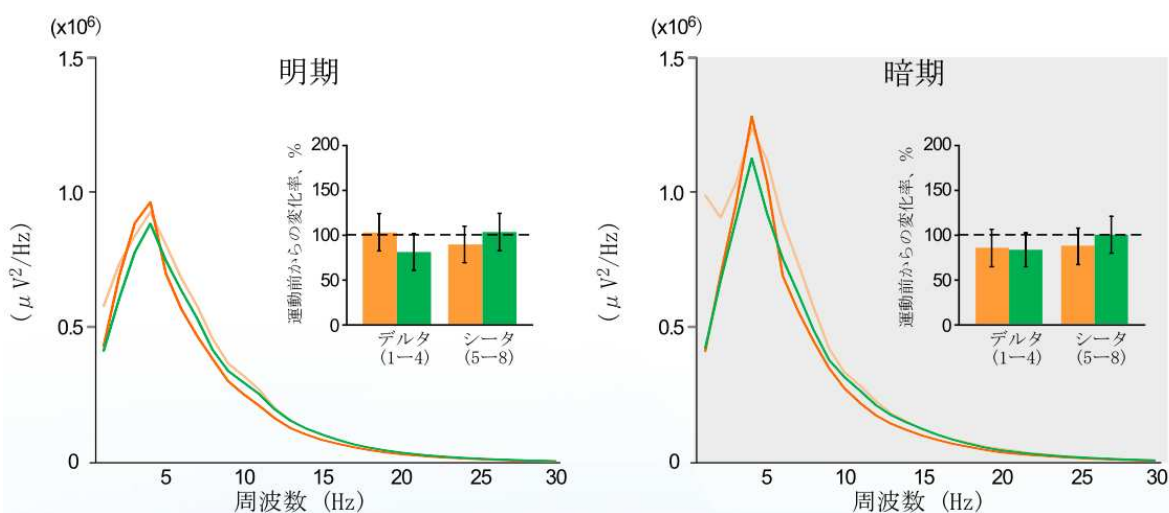


図7：オレキシン系遺伝子改変マウスでは、運動3日後の睡眠の質は向上しない。

(グラフ左) 明期におけるノンレム睡眠時のパワースペクトル (グラフ内側) デルタ波 1-4Hz およびシータ波 5-8Hz における運動前からの変化率。(グラフ右) 暗期におけるノンレム睡眠時のパワースペクトル (グラフ内側) デルタ波 1-4Hz およびシータ波 5-8Hz における運動前からの変化率。(*Orexin/ataxin3*: コントロール; 薄橙色、運動後; 濃橙色) (*OXRDKO*: コントロール; 薄緑色、運動後; 濃緑色)

れなかった (図 7)。これらのことから、運動後の睡眠の質の向上にはオレキシン神経系が関わっていることが示唆された。また、両オレキシン受容体欠損マウスにおいても運動後のデルタ波量に変化が観察されなかったことから、オレキシン神経の投射先が関与していることが考えられる。

4. 考察

本研究は、運動後のノンレム睡眠量およびノンレム睡眠時におけるデルタ波量が非運動群と比較して有意に増加することを明らかにした。また、運動の睡眠への影響を報酬やエネルギー補給との組み合わせのなかで検討した結果、運動後の報酬・エネルギー補給によって、運動直後のノンレム睡眠時デルタ波量が有意に増加することを見出した。さらに、睡眠・覚醒の制御にかかわるオレキシン神経脱落マウスおよびオレキシン受容体欠損マウスを用いた結果、運動後におけるノンレム睡眠時デルタ波量の増加にはオレキシン神経が必須であることを明らかにした。これらの結果は、運動後の睡眠にかかわる制御機構についての理解をさらに深めるとともに、摂食・報酬系の関与も重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

5. 結言

本研究のように、運動と睡眠をつなぐ神経回路や分子機構の解明を目指した研究は、重要かつ普遍的な問題であるにもかかわらず、基礎的研究が極めて少ない研究である。運動が睡眠をどのように制御しているのかが明らかになれば、睡眠を改善するためのより効果的な運動の方法を提案することが可能となる。また、運動後の睡眠を促進する制御機構を分子レベルで明らかにすることにより、運動の効果を最大化するための様々な介入の方法やヒトを対象とした、より大規模な研究に発展させることができる。これにより国民の健康の増進に貢献する新たな方策を提案することが可能となる。

今後は、運動によるノンレム睡眠中デルタ域増大が見られなかったオレキシン遺伝子改変マウスを用いて野生型 C57BL マウスと比較し、運動後の活動性に差の見られる脳領域を c-Fos 免疫染色法を用いて検討する。運動後のノンレム睡眠中デルタ波が最も増加する時間にマウス脳を固定・摘出し、活性化した神経細胞を可視化できる c-Fos 抗体を用いて、活性化神経細胞数の増加する領域を調べていく。また、運動による睡眠変化に深く関与していると考えられる脳部位を、最近開発された DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug: DREADD) と呼ばれる手法により活性化または抑制する。具体的には、運動後のデルタ波スペクトル値を制御する脳部位にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを投与して、人工 GPCR 受容体である hm3Dq または hm4Di を発現させる。運動中または運動後に hm3Dq および hm4Di の特異的リガンドである CNO を腹腔内投与して、運動によるデルタ波変化への影響を検討していく。

参考文献

1. Chemelli et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 1999 Aug 20;98(4):437-51.
2. Chennaoui M, Arnal PJ, Sauvet F, Léger D. Sleep and exercise: a reciprocal issue? *Sleep Med Rev*. 2015 Apr;20:59-72.
3. Hara, J. et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. 2001 May;30(2):345-54.

4. Kubitz K, Landers DM, Petruzzello SJ, Han M. The effects of acute and chronic exercise on sleep. A meta-analytic review. *Sports Med.* 1996 Apr;21(4):277-91.
5. Sakurai T. et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 1998 Feb 20;92(4):573-85.